昆虫对植物蛋白酶抑制素的诱导及适应机制

宗　娜，阎云花，王琛柱*
（中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京　100080）

摘要：植物蛋白酶抑制素是植物重要的防御物质之一，一般是分子量较小的多肽或蛋白质，能够与昆虫消化道内的蛋白酶形成复合物，阻断或削弱蛋白酶对食物中蛋白的水解，使昆虫厌食或消化不良而致死。植物蛋白酶抑制素在植物体内一般是诱导表达的，昆虫取食危害后，导致某些植物在伤口产生一种寡聚糖信息素——蛋白酶抑制素诱导因子，蛋白酶抑制素诱导因子诱导叶片局部产生植物蛋白酶抑制素，并刺激产生信号物质系统肽，通过十八烷酸途径在一系列酶的作用下产生茉莉酸，茉莉酸与受体结合，活化植物蛋白酶抑制素基因。昆虫在长期取食植物蛋白酶抑制素后会在生理及行为上产生适应性而导致不敏感，适应方式主要包括：（1）改变肠道蛋白酶对蛋白酶抑制素的敏感性；（2）水解蛋白酶抑制素；（3）过量取食及干扰产生蛋白酶抑制素的信号通道。由于昆虫能够对植物蛋白酶抑制素产生适应，因此合理利用植物蛋白酶抑制素的抗虫作用显得十分重要。

关键词：植物蛋白酶抑制素；植食性昆虫；诱导；适应
中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2003）04-0533-07

Plant proteinase inhibitor：induction and adaptation in insects

ZONG Na，YAN Yun-Hua，WANG Chen-Zhu*（State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents，Institute of Zoology，Chinese Academy of Sciences，Beijing　100080，China）

Abstract：The induction of plant proteinase inhibitor（PPI）by insects has been the subject of considerable research interest. After being attacked by insects some plants can release proteinase inhibitor inducing factor（PIIF）at the site of injury. PIIF stimulates the production of systemin which activates the synthesis of jasmonic acid through the octadecanoid pathway. Jasmonic acid activates the PPI gene causing new PPI to be synthesized. On the other hand，insects can develop adaptations to PPI through the following mechanisms：（1）changing the sensitivity of the insect proteinase to PPI；（2）decomposing PPIs；（3）feeding excessively and interfering with the PPI production signal pathway. The signal molecules and their functions in inducing PPI production and the adaptation to PPI by insects are reviewed.

Key words：plant proteinase inhibitors；herbivorous insect；induction；adaptation

植物与植食性昆虫在长期的协同进化过程中不断地相互作用，彼此形成了许多防御及适应机制（钦俊德和王琛柱，2001）。对植食性昆虫的取食为害，植物有两个方面的化学防御反应。一方面是直接防御（direct defense），植物产生对昆虫有毒或抑制取食的次生代谢物质；另一方面是间接防御（indirect defense），即产生并且释放挥发性次生代谢物质招引害虫天敌，从而减少植食性昆虫的危害（Ryan，1992；Dick，1999）。与此同时，昆虫也对植物的防御机制产生了相应的适应对策，表现在行为和生理生化等方面。随着基因工程研究的进展，植物源的防御蛋白倍受重视，植物蛋白酶抑制素（plant proteinase inhibitor，PPI）就是其中的一类。

植物蛋白酶抑制素是一类分子量较小的多肽或蛋白质，能够与昆虫消化道内的蛋白消化酶形成复合物，阻断或削弱蛋白酶对食物中蛋白的水解，使昆虫厌食或消化不良而致死。在某些植物如番茄和马铃薯体内，植物蛋白酶抑制素一般存在于种子或贮藏组织（如块茎）中，而不在或很少在叶、茎或根中表达，但当这些组织或器官受到损伤后即可诱

基金项目：国家重点基础研究发展规划项目（G2000016208）；中国科学院知识创新工程重要方向（KSCX2-SW-105）；中国科学院知识创新工程领域前沿项目（KSCX3-IOZ-05）
作者简介：宗娜，女，1976年11月生，山东临朐人，昆虫生理学博士生
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：czwang@panda.ioz.ac.cn
收稿日期 Received：2002-11-22；接受日期 Accepted：2003-02-20

导植物蛋白酶抑制素在损伤部位大量表达。根据植物蛋白酶抑制素的活性基团可将其分为丝氨酸类、半胱氨酸类、天冬氨酸类及金属类（王琛柱和钦俊德，1997）。目前已从马铃薯、豇豆、大豆、番茄、绿豆和慈菇等多种植物中获得了丝氨酸蛋白酶抑制素基因。已有许多转植物蛋白酶抑制素基因的植株问世，有的已在生产中得到应用（Ussuf *et al*.，2001）。

目前，在植物蛋白酶抑制素研究中，有两个问题很受关注。一个问题是昆虫诱导植物体产生植物蛋白酶抑制素的机制如何？另一个问题是昆虫能否对植物蛋白酶抑制素产生适应以及如何适应？明确这两个问题对合理持久地利用植物蛋白酶抑制素增强作物抗虫性有重要意义。

1 昆虫对植物蛋白酶抑制素的诱导机制

植物蛋白酶抑制素的损伤诱导是昆虫和植物共同作用的结果，涉及昆虫和植物的许多物质。马铃薯在受到昆虫危害后会合成 20 多种与防御相关的蛋白，这与动物受创伤后的发炎反应相似（Constabel and Ryan，1998）。这些新合成的蛋白可分为几个功能组：①抗营养蛋白，如植物蛋白酶抑制素和多酚氧化酶（polyphenol oxidase，PPO）；②信号通道物质，主要是一些酶，如脂氧合酶（lipoxygenase，LOX）、前系统肽（prosystemin）、系统肽（systemin）及其受体、NADPH 氧化酶等（Ryan，2000）。植物蛋白酶抑制素和多酚氧化酶都有抗营养的作用，使昆虫营养缺乏；虫害诱导的信号通道物质能够使植物对损伤的信号扩大，在短时间内产生最大的防御反应。昆虫取食诱导植物蛋白酶抑制素的信号转导模式见图 1。

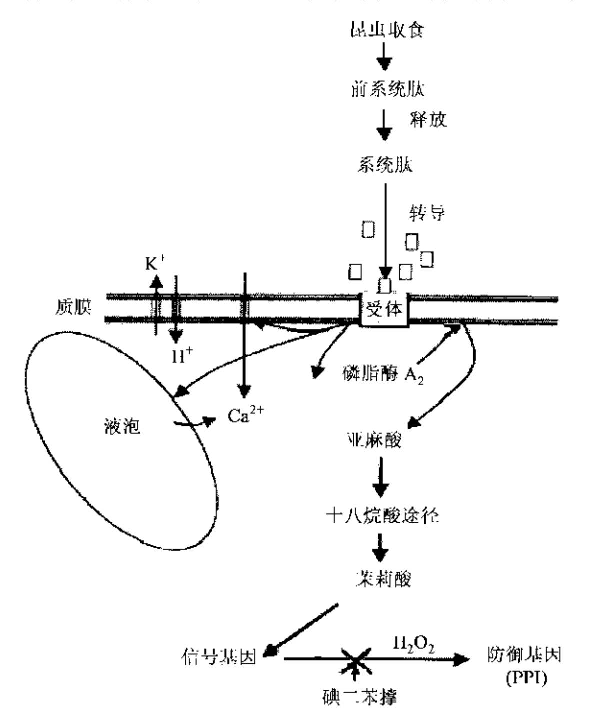


图 1 虫害系统诱导番茄蛋白酶抑制素产生的信号转导模式
（仿 Ryan，2000 and Martha *et al*.，2001）

Fig. 1 A model for the systemic signaling pathway of defensive (PPI) genes that are activated by herbivore attacks in tomato plants
(Adapted from Ryan，2000 and Martha *et al*.，2001)

1.1 植物体内的信号分子

昆虫取食植物时破坏了植物伤口处的组织细胞，植物细胞壁的果胶碎片被水解酶分解为寡聚半乳糖醛酸片段，它是蛋白酶抑制素诱导因子（protein inhibitor inducing factor，PIIF）的主要成分，由此激活伤口周围组织的 *pin* 基因，从而产生局部防御。与此同时内源产生的系统肽运输到整个植株，并通过茉莉酸途径激活远离伤口组织的 *pin* 基因，产生系统防御作用（Bishop *et al*.，1984）。植物蛋白酶抑制素在植物体内的系统诱导是一个信号级联放大的过程，昆虫取食的信号由质膜外的系统肽传递至膜内的亚油酸，再通过多步酶促反应产生茉莉酸。茉莉酸激活植物蛋白酶抑制素的表达，其中，H_2O_2 也是重要的信号物质。

起初认为植物蛋白酶抑制素也是由蛋白酶抑制素诱导因子实现的，但这种看法在后来得到了纠正，因为蛋白酶抑制素诱导因子的分子量在 5 000 ~ 10 000 之间，它在植物体内的移动性很差，不能长距离运输，主要作用是激活伤口周围的植物蛋白酶抑制素基因，而不能直接传导到整个植株。行使系统传递功能的物质是后来发现的系统肽（Shumway *et al*.，1976；Gustafson and Ryan，1976）。

1.2 系统肽和前系统肽的功能及传导途径

植物经昆虫取食在伤口部位产生的系统肽，是一种由 18 个氨基酸组成的短肽信号物质，经韧皮部运输到其他部位，在极低的浓度下发挥作用（fmol/植株），系统诱导植物防御基因的表达（Ryan，2000）。系统肽的前体即前系统肽是一个由 200 个氨基酸组成的多肽，它在未受伤叶片中的表达量很低，在损伤叶片中的表达量成倍增加。转入前系统肽基因的番茄在未受到诱导的情况下依然能够表

达防御蛋白，蛋白酶抑制素的积累量可达到每克叶组织几百微克的极高水平（McGurl *et al.*，1992；Dombrowski *et al.*，1999）。当野生型的番茄嫁接到转前系统肽基因的番茄植株上后，在未受到损伤的情况下也合成了高水平的植物蛋白酶抑制素，说明系统肽或系统肽产生的信号能够由转基因番茄传入嫁接的番茄，并活化损伤防御基因（Ryan，2000）。从其他茄科植物，如马铃薯、青椒中也分离到了前系统肽，它们同番茄前系统肽的序列同源性达到73%～80%，并且具有相同的功能（Constabel and Ryan，1998）。

利用^{125}I放射性标记技术，从番茄 *Lycopersicon peruvianum* 叶肉质膜分离到了一个分子量为160 kD的系统肽结合蛋白，它同系统肽的结合表现出特异性和可逆性（Scheer and Ryan，1999）。系统肽与系统肽结合蛋白的结合导致磷脂酶（PLA_2）的活化及亚麻酸（linoleic acid，LA）的释放。这一过程包括质膜的去极化，离子通道的开放，细胞内钙离子浓度的增加，质膜ATPase质子泵的抑制，分裂素活化蛋白激酶的活化，钙调蛋白（calmodulin）的合成等反应（Usami *et al.*，1995；Stratman and Ryan，1997；Meindl *et al.*，1998；Schaller and Oecking，1999）。磷脂酶从质膜释放亚麻酸，经植物二烯酸转变为茉莉酸，最后导致防御基因的表达。

除了系统肽以外，Pearce等（2001）还在烟草中发现了另外两种能诱导防御基因表达的多肽。它们均由18个氨基酸残基组成，来自具有165个氨基酸残基的同一前体多肽，分别被命名为烟草系统肽Ⅰ及烟草系统肽Ⅱ，能够通过十八烷酸途径诱导活化防御基因。

1.3 茉莉酸及其合成途径

茉莉酸是植物受虫害损伤后产生的防御诱导信号。Ryan及其同事最早提出茉莉酸在植物蛋白酶抑制素基因的虫害伤诱导中起重要作用（Farmer and Ryan，1992）。番茄叶片表面施用亚麻酸及由亚麻酸产生茉莉酸过程中的中间产物，用系统肽及寡聚半乳糖片段处理时都能够活化植物蛋白酶抑制素基因。

植物中茉莉酸的结构及其合成途径与动物的前列腺素极其相似，其合成是通过由亚麻酸起始的十八烷酸途径，而在动物中是从20碳的花生四烯酸开始。茉莉酸是植物诱导防御反应过程中的重要一环，其生成过程中涉及的酶不但是茉莉酸合成的必要条件，同时也是植物诱导防御的重要信号分子。茉莉酸合成所需要的亚麻酸是由亚油酸通过ω-3脂肪酸脱饱和酶完成的。亚麻酸经过多步酶促反应最后合成了茉莉酸，其中首先通过叶绿体内脂氧合酶，丙二烯氧化合成酶，丙二烯氧化环化酶生成12-氧合植物二烯酸（12-oxo-PDA），12-oxo-PDA再通过12-oxo-PDA还原酶的作用及三轮β-氧化最后生成茉莉酸（Vick，1993）。

1.3.1 ω-3脂肪酸脱饱和酶：ω-3脂肪酸脱饱和酶催化十六碳二烯酸和亚油酸分别转化为十六碳三烯酸和亚麻酸的反应。茉莉酸的合成是以亚麻酸为前体的，因此ω-3脂肪酸脱饱和酶在植物的损伤诱导防御中起重要的作用。烟草受损伤后，ω-3脂肪酸脱饱和酶发生累积（Hamada *et al.*，1996），这为茉莉酸的合成提供了丰富的亚麻酸。同样番茄损伤后，亚油酸的含量也有所增加，说明损伤活化了脂肪酸脱饱和的整个途径。质膜释放不饱和脂肪酸是植物损伤防御信号转导的一个关键步骤（Conconi *et al.*，1996）。

1.3.2 脂氧合酶：在拟南芥、大豆、大麦、黄瓜及马铃薯中都发现脂氧合酶在植物损伤及受茉莉酸诱导后能大量表达。脂氧合酶是一种非血红素氧化还原酶，在植物中普遍存在，由一个大的基因家族编码（Siedow，1991；Nellen *et al.*，1995）。它催化1,4-戊二烯不饱和脂肪酸的加双氧反应，把分子氧加到不饱和脂肪酸的Δ9或Δ13双键，分别产生9-位或13-位的氢过氧化物，这是茉莉酸合成过程中的重要步骤。

1.3.3 丙二烯氧化合成酶及丙二烯氧化环化酶：亚麻酸的13位氢过氧化物转化为12-氧-植物二烯酸（12-oxo-PDA）是茉莉酸生物合成的必须步骤，这一反应是由丙二烯氧化合成酶及丙二烯氧化环化酶催化的。丙二烯氧化合成酶是细胞色素P450酶的CYP74A族。亚麻的丙二烯氧化合成酶的cDNA序列已被克隆，由此推导出的蛋白质序列表明，该酶是一个由58个氨基酸组成的典型叶绿体多肽，其基因在损伤后表达大量增加（Laudert *et al.*，1996）。在拟南芥和番茄中，丙二烯氧化合成酶、丙二烯氧化环化酶的催化步骤是十八烷酸途径的关键步骤，从12-oxo-PDA到茉莉酸则是 *pin* 基因活化的必要步骤（Wasternack *et al.*，1998）。

1.3.4 12-oxo-PDA脱饱和酶：茉莉酸合成的关键前体3-氧-2-戊烯-环戊烷-1-辛酸是由12-oxo-PDA脱饱和酶催化12-oxo-PDA的10位及11位双键还原生成的，此酶存在于细胞质中，既能与质体结合又能

与微粒体结合（Schaller and Weiler，1997）。3-氧-2-戊烯-环戊烷-1-辛酸经过 3 轮 β-氧化生成茉莉酸。β-氧化首先需要乙酰辅酶 A 合成酶将其底物活化生成相应的乙酰辅酶 A 衍生物，然后再经过乙酰辅酶 A 氧化酶氧化。在拟南芥中已经鉴定出一个虫害损伤诱导的乙酰辅酶 A 合成酶基因（Titarenko *et al*.，1997）。最后茉莉酸被释放到细胞质中与游离的受体或与膜结合的受体结合，启动下一步的反应。

1.4 H_2O_2

活性氧是植物虫害防御反应系统的一部分，植物被昆虫咬食后能导致 H_2O_2 的产生（Bolwell，1999）。H_2O_2 在诱导防御系统的下游调节防御基因的表达，它的量受 NADP 氧化酶的调节（Martha *et al*.，2001）。受损伤后番茄对 H_2O_2 及植物蛋白酶抑制素的积累受 NADPH 氧化酶抑制剂咪唑及喋呤的抑制，并且能抑制植物损伤或系统肽、寡聚糖和茉莉酸甲酯诱导的防御基因的表达（Martha *et al*.，2001），但不能抑制受损伤诱导的前系统肽、脂氧合酶及丙二烯氧化酶的基因表达。H_2O_2 可能的产生过程是，当植物受到昆虫取食、机械损伤后，系统肽释放到维管束，在维管薄壁组织细胞内合成茉莉酸，调节信号基因包括聚半乳糖酶的合成，聚半乳糖酶催化产生聚半乳糖醛酸的同时生成 H_2O_2，H_2O_2 由维管细胞扩散到叶肉细胞，活化防御基因的表达（Kubigsteltig *et al*.，1999）。

2 昆虫对植物蛋白酶抑制素的适应

植物产生蛋白酶抑制素是对害虫危害的一种适应手段，同样昆虫也能对植物蛋白酶抑制素产生适应性。Broadway 研究了 6 种鳞翅目昆虫对卷心菜丝氨酸蛋白酶抑制素的反应，结果表明：取食含有植物蛋白酶抑制素的饲料后，绿脉菜粉蝶 *Pieris napi* 和菜粉蝶 *Pieris rapae* 胰蛋白酶活性没有受到显著抑制（0～18%），而小菜蛾 *Plutella xylostella*、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*、舞毒蛾 *Lymantria dispar* 及美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 胰蛋白酶活性受到了显著抑制（55%～85%）；长期取食实验表明，只有粉纹夜蛾的生长发育受到植物蛋白酶抑制素的影响，而其他昆虫的生长发育未受影响（Broadway，1995）。这是某些昆虫对蛋白酶抑制素具有适应性的首次证实。以后人们逐渐注意到昆虫对植物蛋白酶抑制素的适应性问题，其主要适应方式是改变昆虫中肠蛋白酶的敏感性和对植物蛋白酶抑制素的水解及行为适应。

2.1 改变昆虫中肠蛋白酶的敏感性

昆虫蛋白酶基因数量非常巨大，这是蛋白酶种类及数量能不断变化的基础，如棉铃虫 *H*. *armigera* 至少具有 28 个不同的丝氨酸蛋白酶基因（Bown *et al*.，1997）。昆虫体内的蛋白酶单体在特定情况下可能聚合为多亚基的寡聚体。用正常人工饲料喂养烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*，幼虫中肠中具有一种胰凝乳蛋白酶和一种胰蛋白酶；用含有植物蛋白酶抑制素的人工饲料喂养烟芽夜蛾，幼虫中肠中具有一种与前者相同的胰凝乳蛋白酶及 4 种胰蛋白酶 T_1、T_2、T_3 和 T_4。经 SDS-PAGE 及 PAGE 分析表明，T_1、T_2 分别是 T_3 及 T_4 的寡聚体形式。取食含有植物蛋白酶抑制素饲料的烟芽夜蛾，其肠道中的胰蛋白酶具有很低的 K_m 值，同底物结合更加紧密，且易于形成寡聚体（Brito *et al*.，2001）。空间构型的改变，可导致 K_m 值降低，从而也降低了胰蛋白酶对植物蛋白酶抑制素的敏感性。

甜菜夜蛾对寄主植物中的丝氨酸蛋白酶抑制素能产生适应性。取食含有蛋白酶抑制素Ⅱ的烟草叶片后，尽管实验证明植物蛋白酶抑制素同中肠蛋白酶已经紧密结合，但甜菜夜蛾幼虫生长并未受到抑制，而是通过大量分泌对植物蛋白酶抑制素不敏感的蛋白酶而避免了消化能力的突然降低（Johnson *et al*.，1989）。斜纹贪夜蛾 *Spodoptera litura* 取食含有大豆胰蛋白酶抑制素的人工饲料时，只有 1 龄幼虫表现出生长受抑制（McManus and Burgess，1995）。在其它昆虫中也发现过类似的适应现象（Michaud and Bernier *et al*.，1995；Bolter and Jongsma，1995）。尽管不同的昆虫利用不同的蛋白酶，但它们都有可能通过过量分泌对植物蛋白酶抑制素不敏感的蛋白酶来适应植物的蛋白酶抑制素（Michaud，1997）。

2.2 降低植物蛋白酶抑制素在肠道中的稳定性

植物蛋白酶抑制素在昆虫肠道内的稳定性是影响植物蛋白酶抑制素作用的重要因素之一。Girard 等（1998a）在研究植物蛋白酶抑制素 Oryzacystatin Ⅰ（OCⅠ）、Bowman-Birk 抑制素（BBI）对辣根猿叶甲 *Phaedon conchleariae* 的作用时发现，虽然在体外试验中 OCⅠ和 BBI 对甲虫蛋白酶活性表现出了 80%～100%的抑制作用，但当取食含有植物蛋白酶抑制素的葡萄叶片后，甲虫既未表现出生长发育延迟，也未表现出取食量减少，除亮氨酸氨肽酶活

性稍有升高外，蛋白酶的种类及活力也并未改变。这说明辣根猿叶甲对植物蛋白酶抑制素产生了适应性，但并不是通过改变蛋白酶的成分来适应 OCⅠ及 BBI 的。在验证 OCⅠ及 BBI 的稳定性时发现，OCⅠ与中肠提取液混合保温 1 min 就开始降解，3 h 后完全被降解。与 OCⅠ相类似，BBI 同中肠提取液混合，1 min 就开始降解，3 h 后只剩部分活性（Girard *et al*.，1998a）。对有毒物质的水解是昆虫采用的一种非常有效的解毒机制之一，OCⅠ也能被葡萄黑耳喙象 *Otiorynchus sulcatus* 降解，墨西哥豆象 *Zabrotes subfasciatus* 的丝氨酸蛋白酶能降解大豆 α 淀粉酶抑制剂（Michaud and Cantin *et al*.，1995；Ishimoto and Chrispeels，1996）。为了提高植物蛋白酶抑制素的敏感性，防止植物蛋白酶抑制素在体内的降解，应该选择同时利用两种或两种以上的植物蛋白酶抑制素，如内肽酶抑制素和外肽酶抑制素结合使用。

2.3　其它途径

昆虫可以通过取食行为的改变来适应植物体内的蛋白酶抑制素。油菜金头跳甲 *Psylliodes chrysocephaat* 取食含半胱氨酸蛋白酶抑制素的油菜后，体重增长显著高于取食不含植物蛋白酶抑制素的对照油菜的幼虫，经分析发现，幼虫体内蛋白酶的组成及比例没有发生变化，而幼虫的取食量却大大增加，表明幼虫体重的增长是通过过量取食造成的，这是昆虫通过取食行为适应植物蛋白酶抑制素的明显例证（Girard *et al*.，1998b）。

昆虫的取食尽管可激活寄主植物产生植物蛋白酶抑制素的信号通道，但昆虫有可能通过影响或利用植物的信号传递途径来适应植物的诱导防御。Musser 等（2002）发现美洲棉铃虫唾液中的葡萄糖氧化酶能抑制烟草 *Nicotiana tabacum* 的直接诱导防御，此酶催化葡萄糖和分子氧转化为葡萄糖酸和过氧化氢，推测它可能就是通过直接抑制茉莉酸信号的生成或作用于其它信号途径进而影响到烟草的诱导防御的。新的研究表明，美洲棉铃虫能感受到引起植物防卫反应的茉莉酸或水杨酸，并在植物防卫反应产生前或产生的同时，迅速在体内合成细胞色素 P450 解毒酶系，用来降解植物新生的毒素（Li *et al*.，2002）。

3　合理利用植物蛋白酶抑制素增强植物抗虫性的途径

植物产生蛋白酶抑制素必定要消耗物质和能量，从而会降低其生长和繁殖的能力，所以植物产生蛋白酶抑制素等防御物质的生态意义决定于植食性害虫胁迫所造成的生态压力，如果这种压力不存在，那么产生的防御物质便是一种浪费。而植物蛋白酶抑制素的损伤诱导对植物体来说是一种非常经济有效的防御方式，它避免了在非胁迫条件下对资源的浪费，使植物在正常生长条件下将有限的资源有效地投入到营养及生殖生长上。利用植物蛋白酶抑制素的诱导表达特性，我们可以将植物蛋白酶抑制素与具有损伤诱导特性的启动子结合转入植物中，使植物蛋白酶抑制素只在受虫害损伤时大量表达，这样既避免了对资源的浪费又将抗虫性结合起来，可起到事半功倍的作用。虽然到目前为止人们对昆虫肠道蛋白酶的具体种类还不是十分清楚，但研究发现，昆虫肠道内具有 3～6 种主要蛋白酶，10～20 种次要蛋白酶，其中 70% 的蛋白酶对植物蛋白酶抑制素敏感（Roberts，1992）。昆虫肠道内对植物蛋白酶抑制素不敏感的蛋白酶是有限的，昆虫若要成功避开植物蛋白酶抑制素对蛋白酶的抑制作用，那么它产生不敏感的蛋白酶的量就需要达到一定浓度，所以产生不敏感蛋白酶的量的多少也是影响昆虫能否成功避免植物蛋白酶抑制素为害的重要因素。虽然有些昆虫取食含植物蛋白酶抑制素的饲料后昆虫肠道内不敏感的蛋白酶的量增加了 2～3 倍，但是仍然不能恢复正常的消化水平。所以我们认为昆虫对植物蛋白酶抑制素的生理适应是有限的，我们完全可以找到克服昆虫对植物蛋白酶抑制素产生适应性的有效办法。

3.1　利用来自非寄主植物及昆虫自身的蛋白酶抑制素

昆虫体内产生对植物蛋白酶抑制素不敏感的蛋白酶反映了昆虫对寄主植物中高浓度植物蛋白酶抑制素的适应。所以获得有效植物蛋白酶抑制素的一条重要途径就是从昆虫的非寄主植物中选择新的植物蛋白酶抑制素。如 Duan 等（1996）将马铃薯蛋白酶抑制素 PI-2 转入水稻中培育抗虫品种，利用这种方法成功地防治了大螟 *Sesamia inferens*。但有效的植物蛋白酶抑制素并不一定必须从植物中寻找，害虫自身体内存在的蛋白酶抑制素有时也非常有效。玉米幼芽根叶甲 *Diabrotica virgifera* 幼虫自身就含有一种半胱氨酸蛋白酶抑制素，这种蛋白酶抑制素是某些昆虫中肠蛋白酶的有效抑制剂，大量摄入时有剧毒作用。另外通过计算机程序模拟蛋白酶与植物蛋白酶抑制素结合的三维结构，设计合成具

有新的活性位点、与蛋白酶结合更紧密的蛋白酶抑制素，是害虫综合治理中具有广阔应用前景的研究方向（Jongsma *et al*.，1996）。

3.2 同时利用两种或两种以上的抗虫蛋白

目前，已有许多转双植物蛋白酶抑制素基因抗虫植物成功的例子。如将PI-Ⅰ和PI-Ⅱ基因转入烟草中，使表达胰蛋白酶抑制素及胰凝乳蛋白酶抑制素的转基因烟草植株获得了对烟草天蛾的抗性（Johnson *et al*.，1989）。此外，同时利用植物蛋白酶抑制素和其他抗虫基因（如Bt毒蛋白基因或淀粉酶抑制剂基因等）也是获得有效抗虫植株的重要途径。有些植物蛋白酶抑制素还能同时抑制α-淀粉酶活性，这些植物蛋白酶抑制素同时具有两个抑制位点，一个专于抑制蛋白酶而另一个专于抑制α-淀粉酶，能同时紧密结合并抑制蛋白酶和淀粉酶的活性，具有良好的杀虫效果（Campos and Richardson，1983）。

以上讨论了植食性昆虫对植物的损伤诱导过程，其中涉及到信号传递物质的作用及昆虫对植物蛋白酶抑制素产生的适应及其适应方式，并讨论了合理利用植物蛋白酶抑制素增强植物抗虫性的有效途径。植物蛋白酶抑制素与昆虫蛋白酶的相互作用一直是昆虫生态、生理生化专家感兴趣的课题之一。在进化过程中，植物产生了种类丰富的植物蛋白酶抑制素，能在不同的pH下抑制蛋白酶的水解作用，而且几乎任何一种蛋白酶都有相应的抑制素发现。虽然植物蛋白酶抑制素在植物体中的诱导表达十分复杂，但同时也是有规律可循的，相信随着科研工作的不断深入，植物蛋白酶抑制素的抗虫优势将会得到更好发挥，昆虫对它的适应问题也会不断地得到解决。

参 考 文 献（References）

Bishop P，Pearce G，Bryant J E，Ryan C A，1984. Isolation and characterization of the proteinase inhibitor inducing factor from tomato leaves: Identity and activity of poly- and oligogalacturonide fragments. *J. Biol. Chem*.，259: 13 172 – 13 177.

Bolter C J，Jongsma M A，1995. Colorado potato beetles（*Leptinotarsa decamlineata*）adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *J. Insect Physiol*.，41: 1 071 – 1 078.

Bolwell G P，1999. Role of active oxygen species and NO in plant defense response. *Curr. Op. Plant Biol*.，2: 287 – 294.

Bown D P，Wilkinson H S，Gatehouse J A，1997. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest *Helicoverpa armigera* are members of complex multigene families. *Insect Biochem. Mol. Biol*.，27: 625 – 638.

Brito L O，Parra J R P，Terra W R，Silva M C，2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Compar. Biochem. Physiol*.（B），128: 365 – 375.

Broadway R M，1995. Are insect resistant to plant proteinase inhibitor? *J. Insect Physiol*.，41（2）: 107 – 116.

Campos F A，Richardson P M，1983. The complete amine acid sequence of the bifunctional α-amylase/trypsion inhibitor from seeds of ragi（Indian finger millet，*Eleusine coracana* Goertn）. *FEBS Lett*.，152: 300 – 304.

Conconi A，Miquel M，Browse J A，Ryan C A，1996. Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol*.，111: 797 – 803.

Constabel C P，Ryan C A，1998. Prosystemin from potato，black nightshade and bell pepper: Primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Mol. Biol*.，36: 55 – 62.

Dick M，1999. Evolution of induce indirect defense of plants. In: Tollrian R，Harvell C eds. The Ecology and Evolution of Inducible Defenses. Princeton: Princeton University Press. 62 – 68.

Dombrowski J E，Pearce G，Ryan C A，1999. Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，96: 12 947 – 12 952.

Duan X，Li X，Xue Q，Abo-Ei-Saad M，Xu D，Wu R，1996. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor Ⅱ gene are insect resistant. *Nature Biotechnology*，14（4）: 494 – 498.

Farmer E E，Ryan C A，1992. Octandecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*，4: 129 – 134.

Girard C，Métayer L M，Bonadé-Bottino M，1998a. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol*.，28: 229 – 237.

Girard C，Métayer M L，Zaccomer B，Bartlet E，Williams I，Bonadé-Bottino M，Pham-Delegue M，Jouanin L，1998b. Growth stimulation of larvae reared on a transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor. *J. Insect Physiol*.，44: 263 – 270.

Gustafson G，Ryan C A，1976. Specificity of protein turnover in tomato leaves: Accumulation of protein turnover in tomato induced with the wound hormone，PIIF. *J. Biol. Mol*.，251（22）: 7 004 – 7 010.

Hamada T，Nishiuchi T，Kodama H，Nishimura M，Iba K，1996. Cloning of a cDNA encoding tobacco ω-3 fatty acid desaturase. *Gene*，147: 293 – 294.

Ishimoto M，Chrispeels M T，1996. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of α-amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiol*.，111: 393 – 401.

Johnson R，Narvaez J，Ryan C A，1989. Expression of proteinase inhibitors Ⅰ and Ⅱ in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，86: 9 871 – 9 875.

Jongsma M A，Bakker P L，Peter J，1996. Adaptation of *Spodoptera exigua* larva to plant proteinase inhibitors by induction of proteinase activity insensitive of inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，92: 8 041 –

8 045.

Kubigsteltig L，Laudert D，Weiler E W，1999. Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta*，208：463 – 471.

Laudert D，Pfannschmidt U，Lottspeich F，1996. Cloning，molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase（CYP74），the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol. Biol.*，31：323 – 335.

Li X，Schuler M A，Berenbaum M R，2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature*，419（17）：712 – 715.

Martha L，Orozco C，Javier N V，Ryan C A，2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding，systemin，and methyl jasmonate. *Plant Cell*，13：179 – 191.

McGurl B，Pearce G，Orozco-Caedenas M，1992. Structure expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science*，255：1 570 – 1 573.

McManus M T，Burgess E P J，1995. Effect of the soybean（kunitz）trypsin inhibitor on growth and digestive protease of larvae of *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.*，41：731 – 738.

Meindl T，Boller T，Felix G，1998. The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell*，10：1 561 – 1 570.

Michaud D，1997. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends Biotechnol.*，15：4 – 6.

Michaud D，Bernier V N，Overney S，Yelle S，1995. Constitutive expression of digestive cysteine proteases forms during development of the colorado potato beetle *Lepinotarsa decemlineata*（Coleoptera：Chrysomelidae）. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，25：1 041 – 1 048.

Michaud D，Cantin L，Vrain T C，1995. Carboxyl-terminal truncation of oryzacystatin Ⅱ by oryzacystatin insensitive insect digestive proteinase. *Arch. Biochem. Biophy.*，332：469 – 474.

Musser R O，Hum-Musser S M，Eichenseer H，Peiffer M，Gary E，Murphy J B，Felton G W，2002. Caterpillar saliva beats plant defenses. *Nature*，416：599 – 600.

Nellen A，Rojahn B，Kindl H，1995. Lipoxygenase forms located at the plasma membrane. *Naturforsch*，50c：29 – 36.

Pearce G，Moura D S，Stratmann J，Ryan C A，2001. Production of multiple plant hormones from signal poly-protein precursor. *Nature*，411：817 – 820.

Pohnert G，Jung V，Haukioja E，Lempa K，Boland W，1999. New fatty acid amides from regurgitate of lepidopteron（Noctuidae，Geometridae）caterpillars. *Tetrahedron*，55：11 217 – 11 280.

Qin J D，Wang C Z，2001. The relation of interaction between insects and plants to evolution. *Acta Entomol. Sin.*，44（3）：360 – 365.［钦俊德，王琛柱，2001. 论昆虫与植物的相互作用和进化的关系. 昆虫学报，44（3）：360 – 365］

Rayko H，Ursula S，Georg P，Wilhelm B，2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta*（Lepidoptera：Sphingidae）and its natural host *Nicotiana attenuata*. Ⅲ. fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiol.*，125：711 – 717.

Roberts B L，1992. Directed evolution of a protein：selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，89：2 429 – 2 433.

Ryan C A，1992. The search for the proteinase inhibitor-induce factor—PIIF. *Plant Mol. Biol.*，19（1）：123 – 133.

Ryan C A，2000. The systemin signaling pathway：differential activation of plant defensive genes. *BBA-Proteins and Proteomics*，1 477：112 – 121.

Schaller A，Oecking C，1999. Modulation of plasma membrane H^+-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants? *Plant Cell*，11（2）：263 – 272.

Schaller F，Weiler E W，1997. Enzymes of the octadecanoid biosynthesis in plants，12-oxo-phytodienoate 10，11-reductase. *Eur. J. Biochem.*，245：294 – 299.

Scheer J M，Ryan C A，1999. A 160 kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension cultured cells. *Plant Cell*，11：1 525 – 1 535.

Shumway L K，Yang V，Ryan C A，1976. Evidence for the presence of proteinase inhibitor Ⅰ in vacuolar protein bodies of plant cells. *Planta*，129：161 – 165.

Siedow J N，1991. Plant lipoxygenase：structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*，42：145 – 188.

Stratman J W，Ryan C A，1997. Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，94：11 085 – 11 089.

Titarenko E，Rojo E，Leon J，1997. Jasmonic acid dependent and independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*，115：817 – 826.

Usami S，Banno H，Ito Y，Nishihama R，Machida Y，1995. Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，92：8 660 – 8 664.

Ussuf K K，Laxmi N H，Mitra R，2001. Proteinase inhibitors：Plant-derived genes of insecticide protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Curr. Sci.*，80（7）：847 – 853.

Vick B A，1993. Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway. In：Moore T S ed. Lipid Metabolism in Plants. Boca Raton：CRC Press Inc. 167 – 191.

Wang C Z，Qin J D，1997. Protease inhibitor in plants contributing to resistance to insects. *Acta Entomol. Sin.*，40（2）：212 – 218.［王琛柱，钦俊德，1997. 植物蛋白酶抑制素抗虫作用的研究进展. 昆虫学报，40（2）：212 – 218］

Wasternack C，Ortel B，Miersch O，Kramell R，Beale M，Greulich F，1998. Diversity in octadecanoid induced gene expression of tomato. *J. Plant Physiol.*，152：345 – 352.